O Que é a Biotecnologia?
CEFET/RJ - CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA CELSO SUCKOW DA FONSECA
CONHECIMENTOS
AGENTES BIOLÓGICOS
organismos, células, organelas, moléculas
BIOTECNOLOGIA
PRODUZIR BENS
ASSEGURAR SERVIÇOS
ciplina de Biologia
3

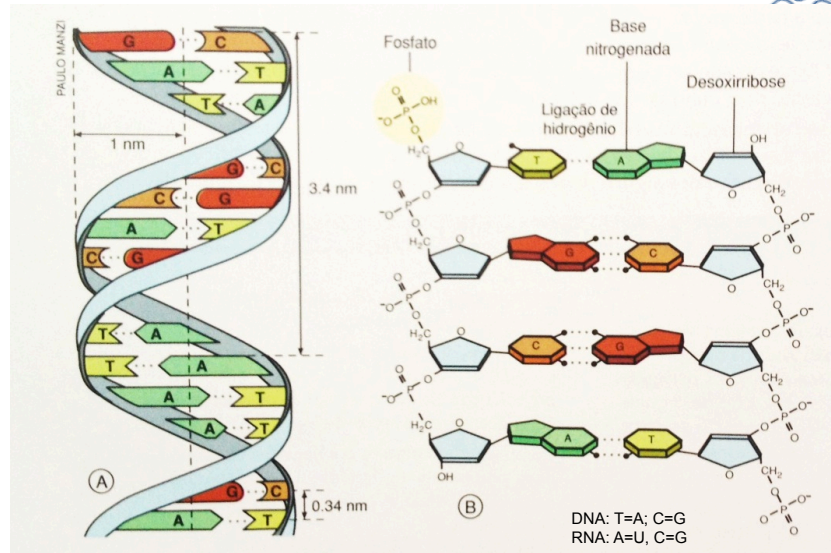
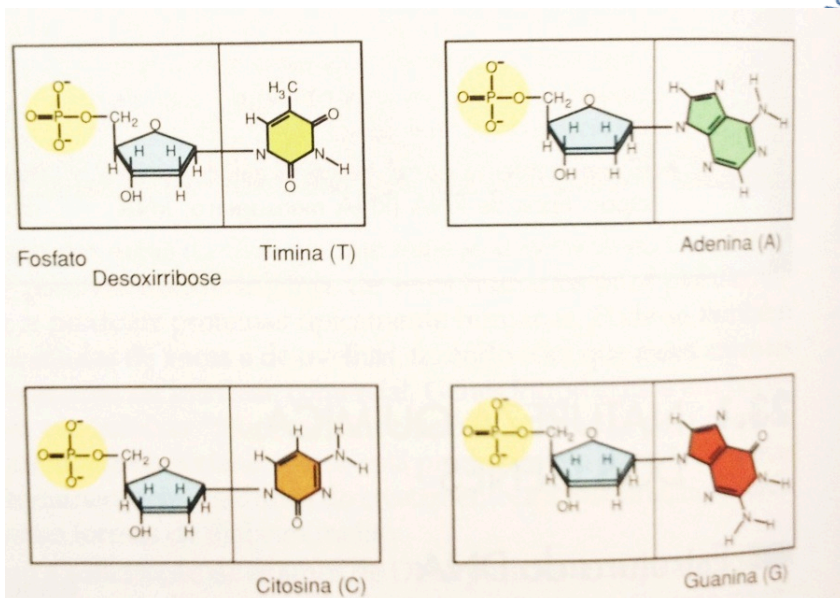
Conhecimento?!
CEFET/RJ - CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA CELSO SUCKOW DA FONSECA
ciplina de Biologia
4

Conhecimento?!
Biológico → mecanismos envolvidos na manutenção dos seres vivos
Processos de produção
CEFET/RJ – CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA CELSO SUCKOW DA FONSECA
Disciplina de Biologia
5

3 áreas do conhecimento:
Ciência Básica
Ciência Aplicada
Tecnologia
Biologia Molecular, Microbiologia, Biologia celular, Genética, Embriologia
Técnicas imunológicas, químicas e bioquímicas
Informática, Robótica, Controle de processos
6

ENGENHARIA GENÉTICA
• O que é?
• Como atua?
CEFET/RJ – CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA CELSO SUCKOW DA FONSECA
Disciplina de Biologia
7

O Que é Engenharia Genética?
Conjunto de técnicas que permitem:
✓ identificação,
✓ manipulação e
✓ multiplicação de genes dos organismos vivos
Desde dec 60 → modelo tridimensional do DNA (Watson e Crick, 1953)
Processo de duplicação, transcrição e tradução genica
Síntese proteica;
Estruturas do DNA: éxons, íntrons, códon de inÍcio e parada de tradução
8

Modelo tridimensional do DNA (Watson e Crick, 1953)

9

10

PROCESSO DE DUPLICAÇÃO, TRANSCRIÇÃO E TRADUÇÃO GÊNICA

DUPLICAÇÃO:

- processo semiconservativo,
- abre a fita de DNA, cada fita “mãe” origina uma complementar
- DNA polimerase = principal enzima do processo
- Processo importante na reprodução ou multiplicação celular.

3′ 5′

DNA

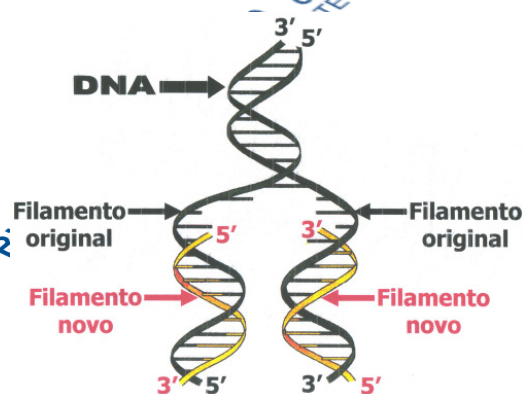
Filamento original

Filamento original

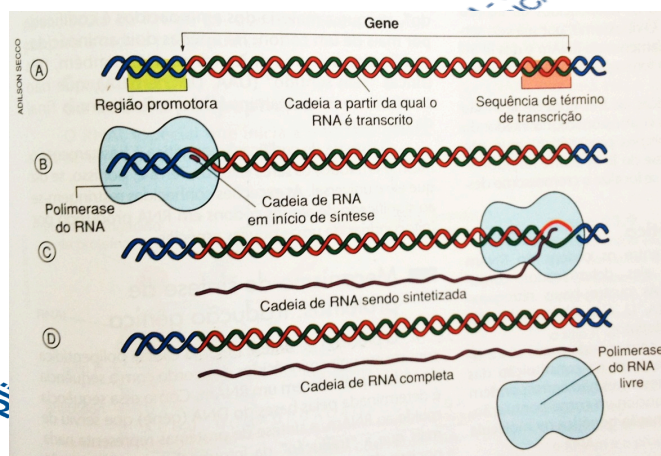
5′ 3′

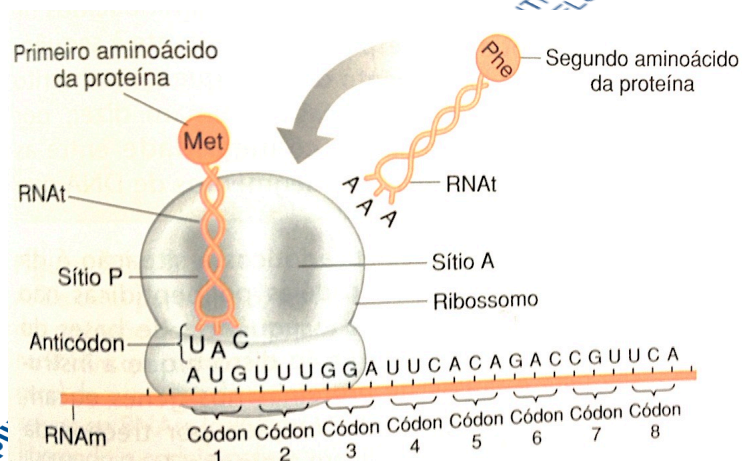
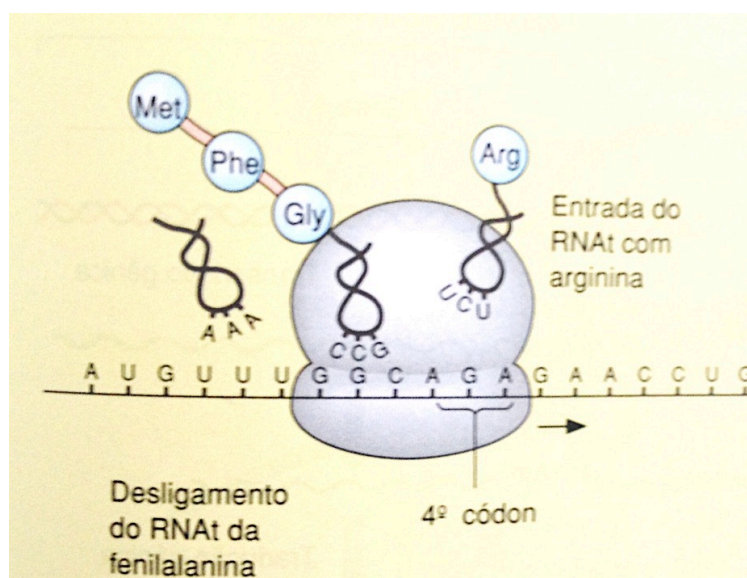
Filamento novo

Filamento novo

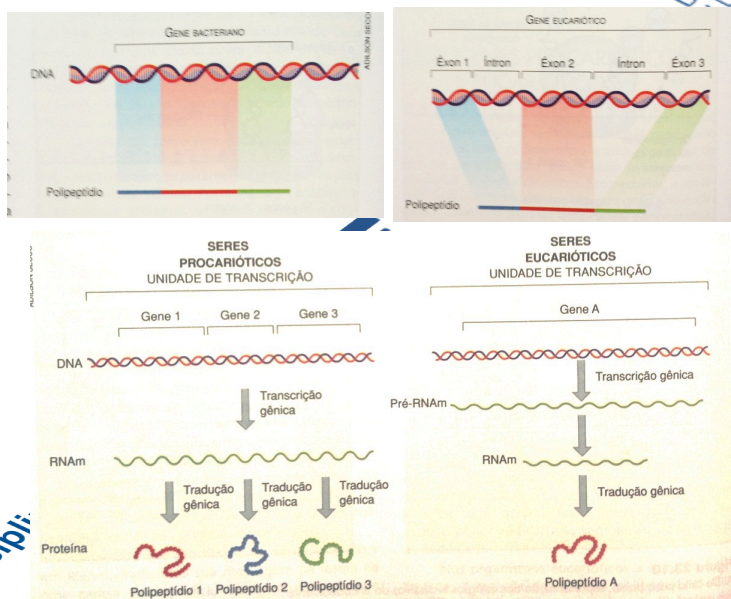
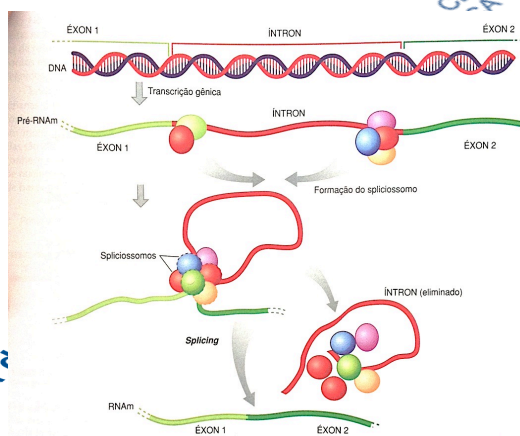
3′ 5′ 3′ 5′

11

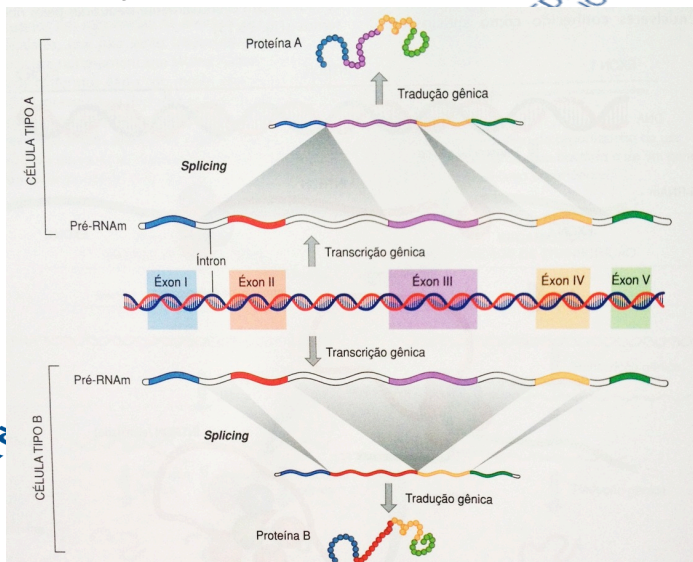
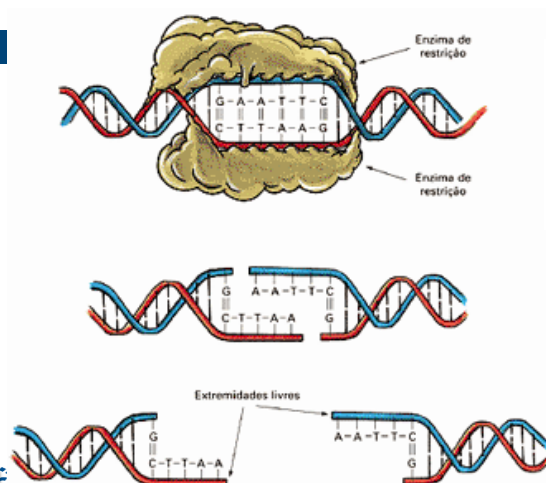
TRANSCRIÇÃO:

- DNA (uma unica fita) → RNA
- RNA polimerase: principal enzima, separa as fitas de DNA e determina o emparelhamento de ribonucleotídeos
- Moléculas de RNA: pré-RNAm, **RNAm, RNAt, RNAr**

12

TRADUÇÃO:
• Síntese de proteínas
• RNAm, RNAt, RNAr
Primeiro aminoácido da proteína
Met
Phe
Segundo aminoácido da proteína
RNAt
A A A
RNAt
Sítio A
Sítio P
Ribossomo
Anticódon
U A C
A U G U U U G G A U U C A C A G A C C G U U C A
RNAm
Códon 1
Códon 2
Códon 3
Códon 4
Códon 5
Códon 6
Códon 7
Códon 8
13

Met
Phe
Gly
Arg
Entrada do RNAt com arginina
A A A
C C G
U C U
A U G U U U G G C A G A G A A C C U G
Desligamento do RNAt da fenilalanina
4º códon
14

Segunda base do códon

Primeira base do códon	U		C		A		G		Terceira base do códon
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	pare*	UGA	pare*	A
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	pare*	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G

Íntrons e éxons → *splicing*
DNA→ pré-RNAm (introns e éxons) → *splicing* → RNAm (éxons)
Splicing →complexo de enzimas nucleares ditas **spliciossomo**
RNAm só sai do núcleo celular após a remoção de td parte não codificante!
ÉXON 1
ÍNTRON
ÉXON 2
DNA
Transcrição gênica
Pré-RNAm
ÍNTRON
ÉXON 1
ÉXON 2
Formação do spliciossomo
Spliciossomos
ÍNTRON (eliminado)
Splicing
RNAm
ÉXON 1
ÉXON 2
17

30 mil genes → 150 mil tipos de proteínas?!
CEFET/RJ - CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA CELSO SUCKOW DA FONSECA
Disciplina de Biologia
18

30 mil genes → 150 mil tipos de proteínas?!
→ *splicing* permite montar a fita de RNAm de diferentes formas → ***SPLICING* ALTERNATIVO** ("reedição do *script!*")
Proteína A
Tradução gênica
CÉLULA TIPO A
Splicing
Pré-RNAm
Íntron
Transcrição gênica
Éxon I
Éxon II
Éxon III
Éxon IV
Éxon V
Transcrição gênica
Pré-RNAm
CÉLULA TIPO B
Splicing
Tradução gênica
Proteína B
19

Déc. 70: **endonucleases de restrição**
Enzimas bacterianas → cortam o DNA
Enzima de restrição
G-A-A-T-T-C
C-T-T-A-A-G
Enzima de restrição
G A-A-T-T-C
C-T-T-A-A G
Extremidades livres
As endonucleases de restrição, são enzimas bacterianas capazes de cortar as moléculas de DNA em **pontos específicos**, agindo como "**tesouras" moleculares**.
Essas enzimas são utilizadas como ferramentas bioquímicas que permitem cortar moléculas de DNA de forma **controlada e previsível**.
20

Nome da enzima	Bactéria de origem	Sítio de ação
Aha III	*Aphanothece halophytica*	5' – TTT AAA – 3' 3' – AAA TTT – 5'
Bam HI	*Bacillus amyloliquefaciens* H	5' – GGATCC – 3' 3' – CCTAGG – 5'
Eco RI	*Escherichia coli* RY 13	5' – GAATTC – 3' 3' – CTTAAG – 5'
Hind II	*Haemophilus influenzae* Rd	5' – AAGCTT – 3' 3' – TTCGAA – 5'
Taq I	*Thermus aquaticus* YTI	5' – TCGA – 3' 3' – AGCT – 5'

↓↑ Sítios de corte da enzima

21

A engenharia genética possibilita:

1. Identificação de pessoas
2. Mapear o sequenciamento do genoma das espécies animais, incluindo o ser humano (Genoma Humano) e dos vegetais;
3. A clonagem molecular e de indivíduos ou parte desses, como tecidos e órgãos;
4. Produzir **organismos geneticamente modificados (OGM)** e **transgênicos**
5. Desenvolver a terapia genética

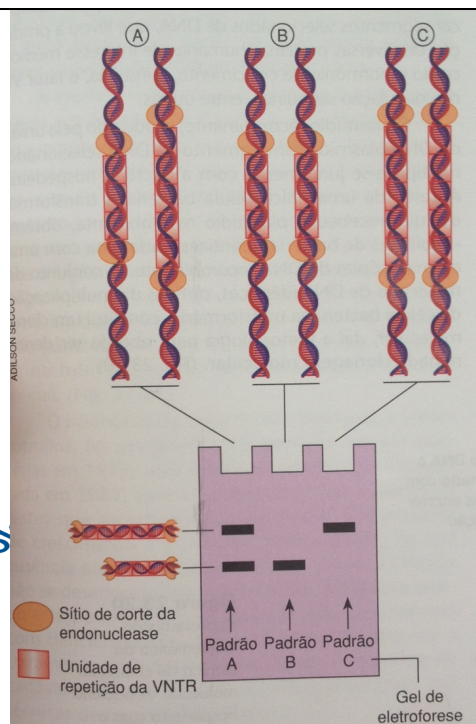
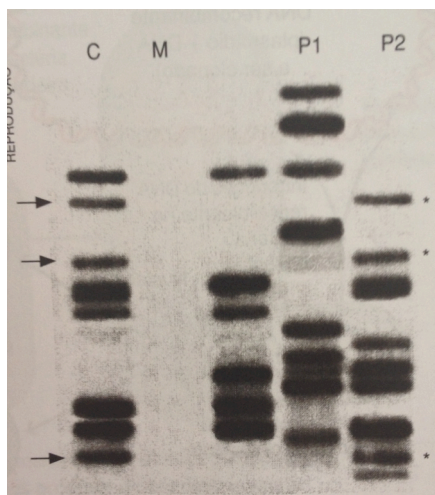
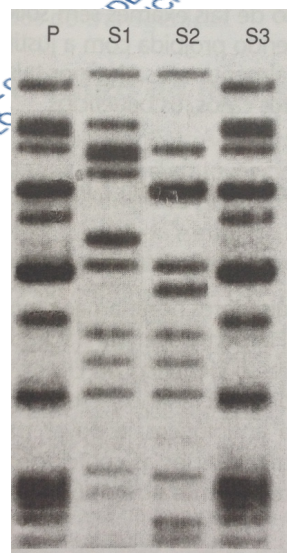
promover melhoramento genético: clássico e molecular

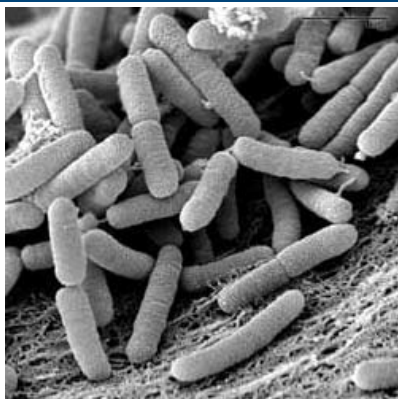
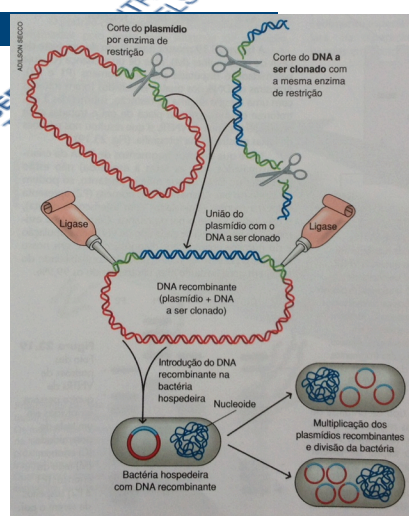
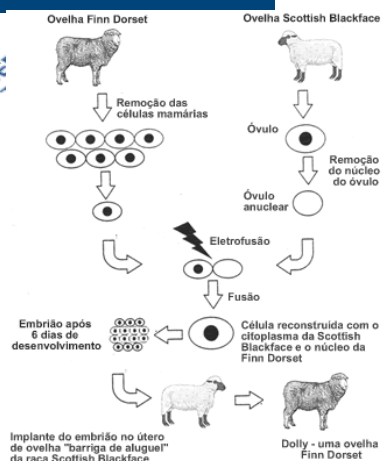
22

1. Identificação de pessoas

- Aplicação de enzimas de restrição em sequencias especificas do DNA humano → VNTR
- VNTR (*variable number of tandem repeats*): regiões que variam em número enormemente entre os indivíduos
- VNTR analisado por eletroforese

Eletroforese

24

PADRÕES DE VNTRs
Teste de paternidade
C
M
P1
P2
Teste de identidade
P
S1
S2
S3

2. Mapeamento do sequenciamento genômico
• Determinação da sequência de nucleotídeos de todos os cromossomos presentes no genoma de determinada espécie
GENOMA HUMANO → 24 cromossomos
22 autossomos
2 sexuais (XX ou XY)
Concluído 2001
3 bilhões de pares de nucleotídeos
97% sequências não codificantes
3% genes, 30 mil genes
99% semelhança chimpanzé
90% semelhança com camundongos
30 mil
13 mil
26

Exemplo de mapeamento no Brasil
Bactéria *Xylella fastidiosa*
clorose variegada dos citros (CVC)
27

3. Clonagem: Molecular
Cópia de uma **molécula de DNA** recombinante, contendo um **gene** ou **outra seqüência de DNA**.
Essa pode ser realizada, por exemplo, através da **inserção do trecho de DNA** que se pretende clonar em um **plasmídio bacteriano**, que posteriormente é inserido em uma bactéria.
Na bactéria, o plasmídio se **replicam independentemente** do cromossomo bacteriano e são **transmitidos às células-filhas** por ocasião da divisão celular.
ADILSON SECCO
Corte do **plasmídio** por enzima de restrição
Corte do **DNA a ser clonado** com a mesma enzima de restrição
Ligase
Ligase
União do plasmídio com o DNA a ser clonado
DNA recombinante (plasmídio + DNA a ser clonado)
Introdução do DNA recombinante na bactéria hospedeira
Nucleoide
Multiplicação dos plasmídios recombinantes e divisão da bactéria
Bactéria hospedeira com DNA recombinante
28

4. OGM e Transgênicos

• TRANSGENICOS: Organismos que recebem e incorporam genes de outra espécie. Esses também são conhecidos como organismos transgênicos.

• OMGs: organismos manipulados, mas sem necessariamente ter inserção de sequencias de outra espécie.

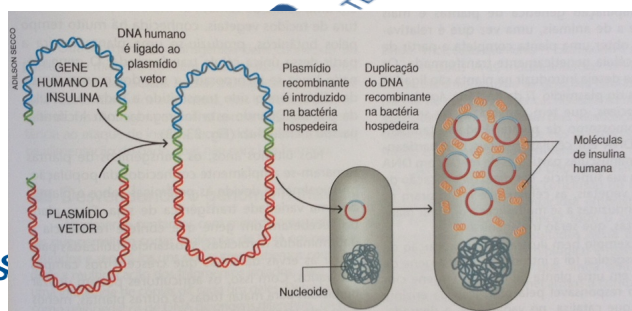
"Todo transgênico é um OGM, mas nem todo OGM é um transgênico!"

• Indispensáveis em estudos acadêmicos que visam compreender melhor a estrutura e o funcionamento dos seres vivos.

• importante ferramenta na área de melhoramento genético, permitindo a criação de novas linhagens de animais e plantas potencialmente mais lucrativas.

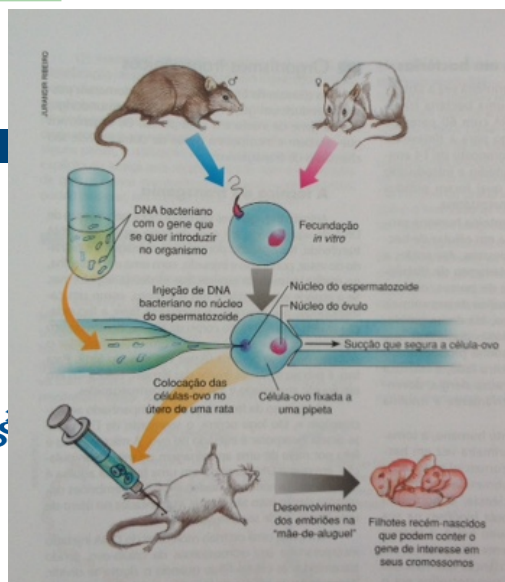
30

Exemplos de OGMs

- Bactérias produtoras de insulina humana

- Outras proteínas humanas como o **hormônio do crescimento** e **o fator VIII de coagulação** sanguínea também são produzidos através dessa técnica.

31

OGM: animal

Processo *in vitro*

32

OGM: vegetal
Técnica de cultura de tecido→ planta a partir de uma única célula transformada
Descargas elétricas de alta voltagem, abrem poros MP cel vegetal sem parede celular (protoplasto)
Eletroporação do protoplasto
Bactérias com moléculas circulares de DNA (plasmídios)
① Extração de DNA dos plasmídios e de DNA do vaga-lume e corte dos DNAs pela enzima de restrição
Vaga-lume
② Produção de DNA recombinante (plasmídio/ vaga-lume)
③ Introdução do DNA em célula de tabaco
④ Multiplicação da célula de tabaco com o gene do vaga-lume
⑤ Desenvolvimento de uma planta de tabaco com o gene de vaga-lume
⑥ A planta de tabaco geneticamente transformada fluoresce ao ser regada com luciferina.
Figura 23.23
Representação esquemática da produção de uma planta transgênica bioluminescente de tabaco por meio da introdução de um gene de vaga-lume. A foto ao lado, tirada no escuro após a planta transgênica ter sido regada com uma solução de luciferina, mostra
ciplina de Biologia
33

Exemplos de OGMs
Algumas plantas cultiváveis atualmente possuem linhagens transgênicas:
Soja transgênica: geneticamente modificada para resistir à herbicida que controla ervas daninhas.
Milho bt: Carrega gene de bactéria Bacillus thuringensis → tóxico para insetos. Utilizado para alimentação de gado, mas não humanos.
melhoramento genético
CEFET/RJ
ciplina de Biologia
34

5. Terapia genética ou gênica

Tratamento baseado na introdução de genes "sadios", para que possa gerar proteínas saudáveis e substituir as defeituosas.

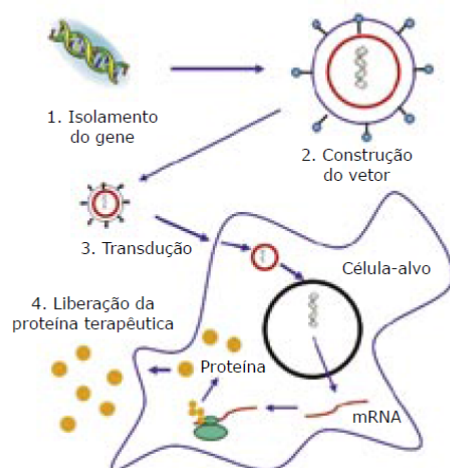
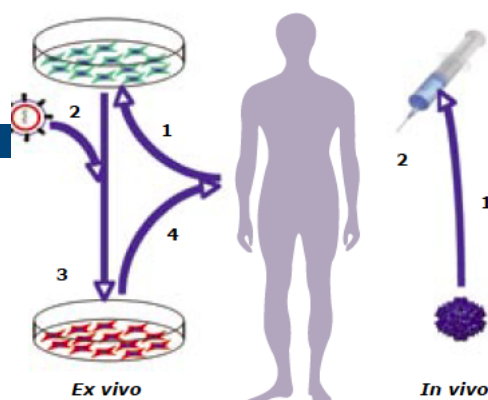
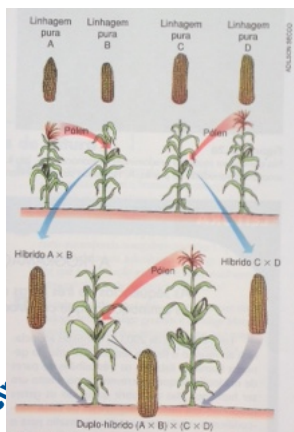
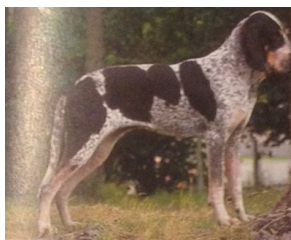
35

5. Terapia genética ou gênica

Etapas envolvidas em um experimento de terapia gênica:

- ✓ o isolamento do gene,
- ✓ a construção de um vetor,
- ✓ a transferência para células no tecido-alvo,
- ✓ a produção da proteína codificada e expressa pelo gene terapêutico nessas células.

36

Etapas envolvidas em um experimento de terapia gênica, exemplificado com um vetor viral
1. Isolamento do gene
2. Construção do vetor
3. Transdução
Célula-alvo
4. Liberação da proteína terapêutica
Proteína
mRNA
37

Estratégias de terapia gênica in vivo e ex vivo
Ex vivo
In vivo
Ex vivo:
1. coleta e cultivo in vitro das células do paciente;
2. transdução com vetor carregando o gene terapêutico;
3. seleção e expansão das células com gene terapêutico;
4. reintrodução das células modificadas no paciente.
In vivo:
1. formulação apropriada do vetor que carrega o gene terapêutico;
2. injeção direta do vetor no tecido-alvo do paciente.
38

EXEMPLOS DE DOENÇAS-ALVO DA TERAPIA GÊNICA
FENILCETONÚRIA
HIPERCOLESTEROLEMIA
ANEMIA FALCIFORME
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (ADA)
39
39

Melhoramento genético clássico
VIGOR DO HÍBRIDO
Melhoramento genético→ seleção de qualidades é feita há anos
40

Melhoramento genético clássico
Seleção artificial
Gado Santa Gertrudes, produzido no King Ranch, em Kigsville no Texas, EUA.
É um ótimo produtor de carne e resistente a doenças parasitárias e ao calor
Resultante do cruzamento de dois tipos
Gado Shorthorn
Ótimo produtor de carne, mas sensível a doenças e ao calor
Gado Braham (Zebu)
Menor produção de carne e é resistente a doenças e ao calor
41

Riscos Genética x Biotecnologia
Perda de variabilidade genética
Modificação do genoma de populações naturais: barreiras dispersão OGMs
Redução de populações naturais e perda de biodiversidade
OGMs → efeitos inesperados produzidos pela transferência de material genético: da produção de novas proteínas alergênicas, da produção de compostos tóxicos, e da redução da qualidade nutricional dos alimentos; resistência humana à antibióticos.
42

Legislação

Lei 8.974, de 5/1/95 (Lei da Biossegurança)
art. 225, §1º, II da Constituição Federal:

- ✓ É dever do Poder Público preservar a diversidade e a integridade do patrimônio genético do país e fiscalizar as entidades dedicadas à pesquisa e manipulação de material genético
- ✓ Controlar os métodos, atividades e comercialização de produtos ou substâncias que possam causar danos ao meio ambiente, incluindo aí os relacionados à manipulação genética.
- ✓ Estabelecendo normas para uso das técnicas de engenharia genética e liberação no meio ambiente de organismos geneticamente modificados.

43

Conclusões

- Diferentes técnicas de engenharia genética podem ser empregadas para o melhoramento de animais e plantas e obtenção de substâncias de interesse econômico → biotecnologia.
- Envolve manipulação da vida: princípios de bioética e biossegurança.
- Área multidisciplinar em fase de desenvolvimento

44

Sugestão de leitura

TERAPIA GÊNICA – UMA REVISÃO DE LITERATURA

JOSIVALDO EMERICK DA VEIGA[1]; NEUSA DE OLIVEIRA ARAUJO[2]; SERGIAN VIANNA CARDOZO[3*]

[1]*Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas (Escola de Ciências da Saúde, Unigranrio);* [2]*Profissional Farmacêutica Autônoma; 3Docente do Curso de Ciências Biológicas (Escola de Ciências da Saúde, Unigranrio), Rua Professor José de Souza Herdy, 1160. CEP 25071-200, Duque de Caxias, RJ.* * sergianvc@gmail.com

Saúde & Amb. Rev., Duque de Caxias, v.4, n.2, p.20-33, jul-dez 2009.

45

Vídeos e sites

- http://eic.ifsc.usp.br/2014/07/05/engenharia-genetica-transgenicos-e-a-tecnologia-do-dna-recombinante/
  - → Parte I: teórica
  - → Parte II: interação com professores – questões
- https://www.youtube.com/watch?v=pKqPHhar2Ao
- http://cib.org.br/
  - → Conselho de Informações sobre Biotecnologia

46